

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

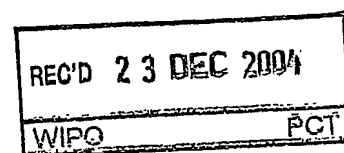
04.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2004年 4月16日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2004-121080  
[ST. 10/C]: [JP 2004-121080]



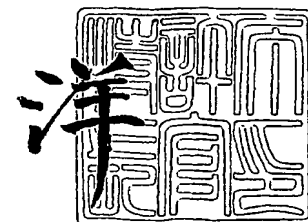
出 願 人  
Applicant(s): 三共株式会社

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 2004037SU  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12Q 1/68  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内  
    【氏名】 小泉 誠  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000001856  
    【氏名又は名称】 三共株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100081400  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 大野 彰夫  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100092716  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 中田 ▲やす▼雄  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100115750  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 矢口 敏昭  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100119622  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 金原 玲子  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100125025  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 越後 友希  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 010216  
    【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 9704937  
    【包括委任状番号】 9704935  
    【包括委任状番号】 0113519  
    【包括委任状番号】 0113520  
    【包括委任状番号】 0302858

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

以下の (a) 乃至 (d) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩:

(a) オリゴヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドが対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(b) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(c) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

(d) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。

**【請求項 2】**

以下の (a) 乃至 (d) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩:

(a) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(b) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(c) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

(d) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。

**【請求項 3】**

18 乃至 25 塩基長からなることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩。

**【請求項 4】**

請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型の検出方法。

**【請求項 5】**

請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法。

**【請求項 6】**

以下の工程 (a) 及び (b) を含む、遺伝子多型の検出方法:

(a) 遺伝子多型部位を含む核酸を鋳型として、請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になって PCR で目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いて PCR を行う工程;

(b) 工程 (a) によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型の有無を判定する工程。

**【請求項 7】**

以下の工程 (a) 及び (b) を含む、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法:

(a) 遺伝子多型部位を含む核酸を鋳型として、請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になって PCR で目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いて PCR を行う工程;

(b) 工程 (a) によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型部位のヌクレオチド配列を決定する工程。

**【請求項 8】**

反応産物の生成の有無の検出に、電気泳動、Taq-Man PCR 及び MALDI-TOF/MS 法からなる群から選択される少なくともいずれか一つを用いることを特徴とする請求項 6 又は 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、請求項 4 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 10】**

以下のものを含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) 以下の (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

(i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

(ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

(iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -O, 4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

(b) (a) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(c) DNA ポリメラーゼ；

(d) PCR 緩衝液。

**【請求項 11】**

以下のものを含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩；

(i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

(ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

(iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -O, 4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

(b) (a) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(c) DNA ポリメラーゼ；

(d) PCR 緩衝液。

**【請求項 12】**

以下のものを含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) 以下の (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩；

(i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

(ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

(iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -O, 4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

(b) (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩；

(i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

(ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

(iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -O, 4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる;

(c) (a) 又は (b) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド;

(d) DNA ポリメラーゼ;

(e) PCR 緩衝液。

**【請求項 13】**

オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチドの塩基長が 18 乃至 25 塩基長であることを特徴とする、請求項 10 乃至 12 のいずれか 1 項に記載の遺伝子多型検出用キット。

**【請求項 14】**

遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、請求項 10 乃至 13 のいずれか 1 項に記載のキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】遺伝子多型の検出方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、E N A ユニットを含むオリゴヌクレオチドを用いたP C Rを利用した、遺伝子多型の検出方法、遺伝子多型の検出用のオリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する遺伝子多型検出用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

ファーマコジェノミクス研究の進展により、遺伝子多型と薬効、あるいは遺伝子多型と副作用の関係から、個々の患者に対する薬物の効果や副作用を、遺伝子診断で予測することが可能になりつつある。このような例としては、薬物代謝酵素の遺伝子多型の例が挙げられる。多型により活性が増加、あるいは、減少する薬物代謝酵素としては、シトクロムP 4 5 0 1 A 2、シトクロムP 4 5 0 2 A 6、シトクロムP 4 5 0 2 C 9、シトクロムP 4 5 0 2 C 1 9、シトクロムP 4 5 0 2 D 6、シトクロムP 4 5 0 2 E 1などが知られている。また、チオプリンメチルトランスフェラーゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、UDP-グルクウロノシルトランスフェラーゼ、および、グルタチオンS-トランスフェラーゼなど抱合酵素と呼ばれる一群の酵素群にも遺伝子多型が存在し、多型により活性が減少することが報告されている（例えば、非特許文献1参照。）。

【0003】

また、遺伝子多型と疾患との関係を調べることにより、一部の疾患の事前診断や予後の判定も可能になりつつあり、多型解析研究から見出された疾患原因遺伝子が多数報告されている。例えば、潰瘍性大腸炎の原因遺伝子としてのH L A、慢性関節リウマチの原因遺伝子としてのT C R  $\alpha$ 、アルツハイマー病の原因遺伝子としてのA P O E 4、精神分裂症の原因遺伝子としてのドーパミンD 3 受容体、躁鬱病の原因遺伝子としてのトリプトファン水酸化酵素、アルブミン尿症の原因遺伝子としてのアンジオテンシン前駆体、心筋梗塞の原因遺伝子としての血液凝固因子V I I、肥満の原因遺伝子としてのレプチンなどが報告されている（例えば、非特許文献2参照。）。

【0004】

遺伝子多型の検出方法として、ポリメラーゼチェーンリアクション（P C R）法と制限酵素による切断とを組み合わせたP C R-R F L P法（例えば、非特許文献3参照。）、配列の異なる一本鎖のDNAもしくはRNAはポリアクリルアミドゲル中で異なる移動度を示すという原理に基づいたS S C P (single-strand conformation polymorphism)法、または、オリゴヌクレオチドプライマーの3' 末端付近にミスマッチがあるとプライマーの伸長反応が阻止されるという原理に基づいたA S - P C R (allele-specific PCR)法などが開発されている。

【0005】

P C R-R F L P法は、検査工程に3～24時間の制限酵素処理を含むために、迅速な方法とはいえない。S S C P法は検査対象となる塩基配列のどこかに、一個もしくは複数の変異が存在する場合に、その存在を高感度に検出できる点で優れている。しかし、微妙な移動度の差を検出するために実験条件を厳密にコントロールしなければならないので、非常に手間がかかる方法であり、かつ変異の位置を同定できない。また、実際の検体、たとえば血液や組織からS S C P法を行うには、クローニングやP C R法を用いて、事前に大量の核酸を調製する必要があり、多数の検体を効率よく検査するには適さない方法である。

【0006】

A S - P C R法はP C Rを応用した方法であり、事前に大量の核酸を調製する必要はなく、3' 末端付近にミスマッチのないプライマーを使用したときのみ増幅産物が得られることを応用したもので、多数の検体を効率よく検査するために適した方法である。しかし、通常のP C Rではプライマーにミスマッチが存在する場合でも増幅産物が得られる場合

があり、厳密性に問題があった。

【0007】

また、AS-PCR法を改変し、3'末端から2番目に対象遺伝子とは相補的ではない塩基を持つヌクレオチドを持ち、3'末端に検出したい多型部分を設定した場合、3'末端から2番目に対象遺伝子と相補的である塩基を持つヌクレオチドをもつプライマーに比べ、3'末端に存在する多型部位の検出が改善される報告がある(例えば、非特許文献4参照)。しかし、この方法を用いた場合でもミスマッチが起こることがあり、より検出感度の高い遺伝子多型の検出方法の開発が求められていた。

【0008】

2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(以下、「ENAヌクレオチド」ともいう。)は天然型のヌクレオチドである。ENAを導入したオリゴヌクレオチドは、相補鎖RNAに対して高い結合能を有している(例えば、特許文献1参照及び非特許文献5参照)。また、ENAヌクレオチドは糖部の2'位酸素原子と4'位炭素原子をメチレン鎖で架橋したヌクレオチドであるLNA(2'-0,4'-C-メチレンヌクレオチド(特許文献2参照。))よりヌクレアーゼに対して高い抵抗性を有するという特徴を持っている(非特許文献6参照。)。しかしながら、ENAヌクレオチドをプライマーとして用いることによってAS-PCRの測定精度を向上させることができるか否かは不明であった。

【0009】

本発明者らは、上記、多型の検出方法の問題点を解決すべく、検討を行ったところ、多型部位を3'末端にし、3'末端から2番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではない塩基を持つヌクレオチドにし、3'末端から3番目にENA修飾が加えられたオリゴヌクレオチドを用いPCRプライマーとして用いた場合、ミスマッチによる増幅産物の生成量が減少し、精度が高く遺伝子多型が検出できること見出し、更に該検出方法に用いることができるキットを提供し、本発明を完成させた。

【特許文献1】特許第3420984号公報

【特許文献2】特開平10-304889号公報

【非特許文献1】中村祐輔編、「SNP遺伝子多型の戦略」、中山書店、2000年6月5日

【非特許文献2】「ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genetics)」、1999年、第22巻、p. 139-144

【非特許文献3】「サイエンス(Science)」、1991年、第252巻、p. 1643-

【非特許文献4】「ジェノミックス(Genomics)」2003年、第82巻、p 390-396

【非特許文献5】「バイオオルガニック&メディカル・ケミストリー(Bioorganic & Medical Chemistry)」、2003年、第11巻、p. 2211-2226

【非特許文献6】「バイオオーガニック メディシナル ケミストリー レター(Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters)」、2002年、第12巻、p. 73-76

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、遺伝子多型を検出する方法及び該方法に使用することができるオリゴヌクレオチドを提供し、さらに、該オリゴヌクレオチドを含む遺伝子多型検出用キットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は鋳型となる核酸のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなる合成オリゴヌクレオチドプライマーを合成する際に、合成オリゴヌクレオチドプライマーの3'末端のヌクレオチドを鋳型のヌクレオチドと相補的ではないヌクレオチドにするとDNA

ポリメラーゼによるプライマーの伸張反応が起こらず、鋳型となる核酸のヌクレオチド配列と完全に相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いた場合にはDNAポリメラーゼによるプライマーの伸張反応が起きる現象を利用した遺伝子多型の検出方法に関する。

#### 【0012】

さらに詳しくは、本発明は、合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列の3'末端を多型部位にし、3'末端から2番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではない塩基を持つヌクレオチドにし、3'末端から3番目のヌクレオチドとして2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットを用いたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることを特徴とする遺伝子多型の検出方法に関する。

本発明は具体的には、

(1) 以下の(a)乃至(d)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩:

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(b) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(c) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

(d) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(2) 以下の(a)乃至(d)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩:

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(b) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(c) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

(d) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(3) 18乃至25塩基長からなることを特徴とする、(1)又は(2)に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩、

(4) (1)乃至(3)のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型の検出方法、

(5) (1)乃至(3)のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法、

(6) 以下の工程(a)及び(b)を含む、遺伝子多型の検出方法:

(a) 遺伝子多型部位を含む核酸を鋳型として、(1)乃至(3)のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になってPCRで目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行う工程;

(b) 工程(a)によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型の有無を判定する工程、

(7) 以下の工程(a)及び(b)を含む、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法:

(a) 遺伝子多型部位を含む核酸を鋳型として、(1)乃至(3)のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になってPCRで目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行う工程;

(b) 工程(a)によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型部位のヌクレオチド配列を決定する工程、

(8) 反応産物の生成の有無の検出に、電気泳動、Taq-Man PCR及びMALDI



ーTOF/MS法からなる群から選択される少なくともいずれか一つを用いることを特徴とする(6)又は(7)に記載の方法、

(9) 遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、(4)乃至(8)のいずれか1項に記載の方法、

(10) 以下のものを含む、遺伝子多型検出用キット:

(a) 以下の(i)乃至(iv)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩:

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる;

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド;

(c) DNAポリメラーゼ;

(d) PCR緩衝液、

(11) 以下のものを含む、遺伝子多型検出用キット:

(a) (i)乃至(iv)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩;

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる;

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド;

(c) DNAポリメラーゼ;

(d) PCR緩衝液、

(12) 以下のものを含む、遺伝子多型検出用キット:

(a) 以下の(i)乃至(iv)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩;

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる;

(b) (i)乃至(iv)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩;

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドから

なる;

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。

(c) (a)又は(b)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド;

(d) DNAポリメラーゼ;

(e) PCR緩衝液、

(13) オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチドの塩基長が18乃至25塩基長であることを特徴とする、(10)乃至(12)のいずれか1項に記載の遺伝子多型検出用キット、

(14) 遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、(10)乃至(13)のいずれか1項に記載のキット、  
からなる。

#### 【0013】

本発明における、遺伝子多型の検出方法の原理は以下の通りである。

#### 【0014】

遺伝子多型を検出したい配列(目的配列)の多型部分にプライマーの3'末端を設定し、3'末端から2番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではない塩基を持つヌクレオチドにし、かつプライマーの3'末端から3番目にENAユニットの修飾を加える。このプライマーと遺伝子多型検出対象のヌクレオチド配列を含む核酸及び該プライマーと対になってPCRで目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを反応液中で核酸合成酵素の混合物と作用させると、プライマーの3'末端が一致する(塩基が相補的である)場合は、核酸合成反応が起こり、遺伝子が増幅される。これに対して、3'末端が一致しない場合は、核酸合成反応が起こらず、遺伝子の増幅は見られない。このように3'末端の塩基が相補する場合は核酸合成反応が起こり、相補しない場合は核酸合成反応が起こらない違いを利用して、ヌクレオチド配列の変異を検出することができる。この原理を図1と図2で説明する。

#### 【0015】

図1は、核酸配列に変異(多型)がない場合を示す。(i)は核酸配列の変異(多型)を調べようとする対象の鋳型核酸で、塩基配列の一部にATGCの配列をもつ。(ii)はプライマーである。このプライマーでは、3'末端から2番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではないヌクレオチドにし(図ではグアニン(G))、それ以外のヌクレオチドは検出対象の遺伝子と相補的なヌクレオチドである。また、3'末端から3番目はENA修飾が加えられたオリゴヌクレオチド(2'-0,4'-C-エチレン-5-メチルウリジン ユニットのeTと表記する)にしている。この場合、(ii)のヌクレオチド配列のうち3'末端から2番目以外のヌクレオチド配列は対応する(i)のヌクレオチド配列と相補な配列になっており、(ii)のヌクレオチド配列のうち3'末端から2番目でミスマッチするものの、鋳型核酸と多型検出用プライマーがアニーリングして2本鎖を形成する。この相補鎖を形成しているオリゴヌクレオチドの3'末端の部分を核酸合成酵素(iii)が認識し、核酸合成反応が進行する。

#### 【0016】

なお、ここに示した具体的なヌクレオチド配列は説明のための例示に過ぎず、本発明が、このヌクレオチド配列のみに有効であることを意味するものではない。

#### 【0017】

図2はヌクレオチド配列に変異(多型)がある場合を示す。(i)はヌクレオチド配列の変異(多型)を調べようとする対象の鋳型核酸で、ヌクレオチド配列の一部にATACの配列をもつ。(ii)はプライマーである。このプライマーでは、3'末端及び3'末端から2番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではないヌクレオチドにし(図ではグアニン(

G) )、それ以外のヌクレオシドは検出対象の遺伝子と相補的なヌクレオシドである。また、3' 末端から3番目はENA修飾が加えられたオリゴヌクレオチド (2' -O, 4' -C-エチレン-5-メチルウリジン ユニットをeTと表記する) にしている。この場合、(ii)のヌクレオチド配列のうち、3' 末端及び3' 末端から2番目のヌクレオシドは対応するヌクレオシドと相補なヌクレオシドになっておらず、(ii)の3' 末端部分が相補鎖を形成しない。この相補鎖を形成していないオリゴヌクレオチドの3' 末端の部分を核酸合成酵素(iii)が認識できず、核酸合成反応は進まない。

#### 【0018】

なお、ここに示した具体的なヌクレオチド配列は説明のための例示に過ぎず、本発明が、このヌクレオチド配列のみに有効であることを意味するものではない。

#### 【発明の効果】

#### 【0019】

本発明により、新規な遺伝子多型の検出方法が提供された。本発明の遺伝子多型の検出方法を用いることにより、天然型のオリゴヌクレオチドを用いる場合に比べより正確に多型を検出できるようになった。

#### 【0020】

また、該方法に用いることができる、遺伝子多型の検出用オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する遺伝子多型の検出用キットも提供された。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0021】

##### 1. 用語の説明

本明細書中において「遺伝子多型」とは、ある遺伝子座において、(a) 1個の塩基が他の塩基に置き換わっているもの（一塩基多型 (SNP)）及び／又は (b) 1から数十塩基（数千塩基のこともある）が欠失や挿入をしているもの（挿入／欠失多型）を意味する。本明細書中において、一塩基多型とはSNP(single nucleotide polymorphism)ともいい、個人間におけるヌクレオチド配列中の一塩基の違いをいう。

#### 【0022】

一塩基多型部分のヌクレオチドとしては2種類のヌクレオチドの変異が存在することが知られており（例えば、アデニンかグアニン、チミンかシトシン等）、その変異の割合は対象となる遺伝子によって異なっている。本明細書中において、「対象遺伝子」とは、遺伝子多型を検出する対象とする遺伝子のことをいう。

#### 【0023】

本明細書においては、対象遺伝子の一塩基多型部位の2種類の塩基の変異のうちで出現頻度の高いヌクレオチドを含む配列を基準配列とし、基準配列中の一塩基多型部位のヌクレオチドを基準ヌクレオチドとし、出現頻度の低いヌクレオチドを含む配列を変異配列とし、変異配列中の一塩基多型部位のヌクレオチドを変異ヌクレオチドとする。

#### 【0024】

また、多型が欠失多型の場合には欠失がない配列を基準配列とし、欠失がある配列を変異配列とする。

#### 【0025】

さらに、多型が挿入多型の場合には挿入がない配列を基準配列とし、挿入がある配列を変異配列とする。

#### 【0026】

また、本明細書中において、「多型を有する」とは、対象遺伝子の目的とする多型を含む配列が変異配列を有することを意味し、「多型を有さない」とは対象遺伝子の目的とする多型を含む配列が基準配列であることを意味する。

#### 【0027】

本明細書中において、「天然型のヌクレオチド」とは、アデニンヌクレオチド、グアニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド、ウラシルヌクレオチド、チミンヌクレオチドをいう。また、「天然型のオリゴヌクレオチド」とは、アデニンヌクレオチド、グアニンヌ

クレオチド、シトシンヌクレオチド、ウラシルヌクレオチド、チミンヌクレオチド等の天然型ヌクレオチドから構成されるオリゴヌクレオチドのことを示す。

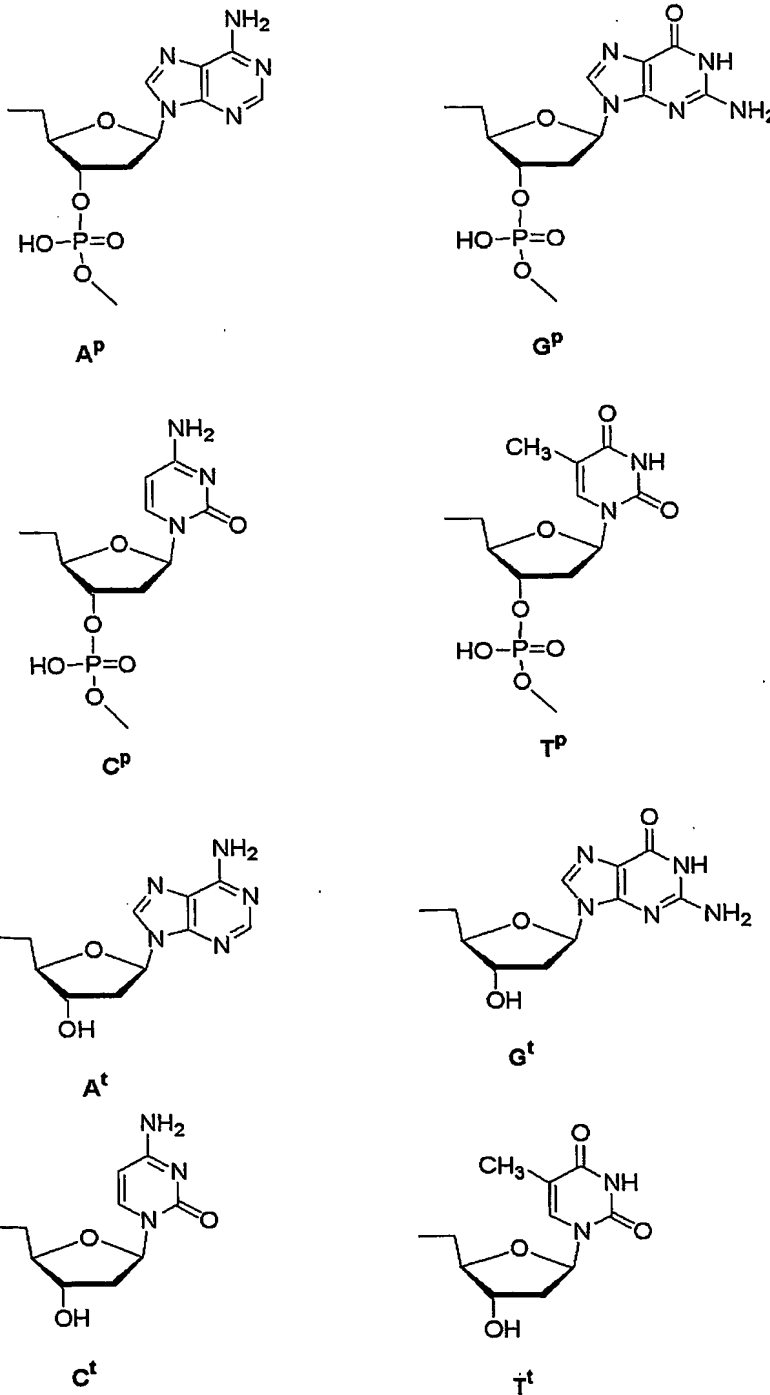
【0028】

本明細書においてはアデニンヌクレオチドを $A^P$ 、グアニンヌクレオチドを $G^P$ 、シトシンヌクレオチドを $C^P$ 及びチミンヌクレオチドを $T^P$ と表記することもある。また天然型のオリゴヌクレオチドの3'末端のヌクレオシド、アデニンヌクレオシドは $A^t$ 、グアニンヌクレオシドは $G^t$ 、シトシンヌクレオシドは $C^t$ 及びチミンヌクレオシドは $T^t$ と表わすことができる。

天然型のヌクレオチドの構造式を以下に示す。

【0029】

【化1】



【0030】

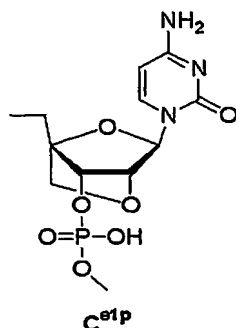
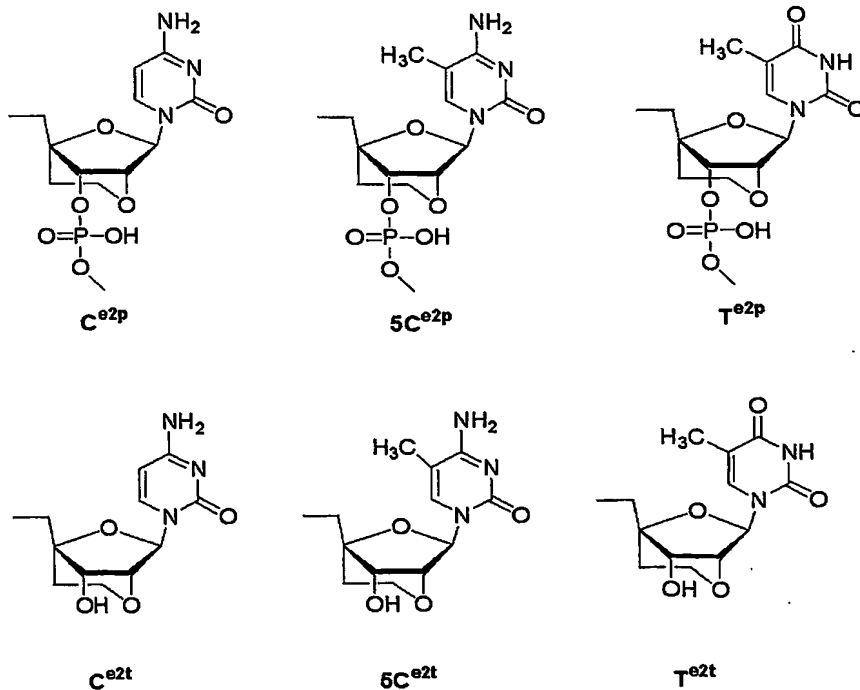
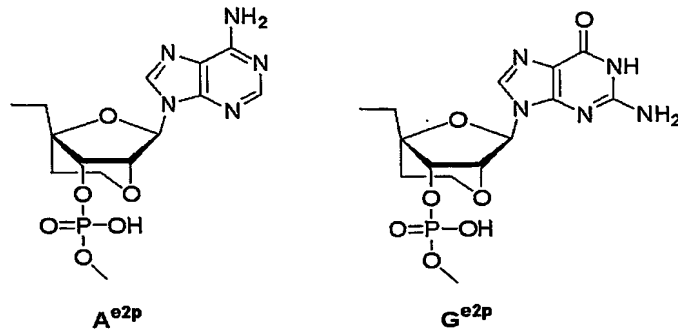
本明細書中において、「ENAヌクレオチド」（以下、「ENA」という。）とは、糖部の2' 位酸素原子と4' 位炭素原子をエチレン鎖で架橋したヌクレオチドである（特許第3420984号参照。）。

【0031】

本明細書において「ENAユニット」とは $A^{e2p}$ 、 $G^{e2p}$ 、 $C^{e2p}$ 、 $5C^{e2p}$ 、 $T^{e2p}$ 、または、オリゴヌクレオチドの3' 末端に有する場合、ENAをヌクレオシドとして扱う場合は、 $C^{e2t}$ 、 $5C^{e2t}$ 、 $T^{e2t}$ 、から選択されるいずれかの基を意味し、その構造は下記に示すとおりである。またLNAユニットとして $C^{e1p}$ の構造も示す。

【0032】

【化2】



**【0033】**

本明細書中における、「相補的なヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの塩基部分が相補するヌクレオチドのことをいい、具体的には、塩基部分がアデニンとチミン、グアニンとシトシン及びアデニンとウラシルであるヌクレオチドが互いに相補的なヌクレオチドである。

**【0034】**

本明細書中における、「その塩」とは、本発明の化合物は、塩にすることができるので、その塩をいい、そのような塩としては、好適にはナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩等の金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、*N*-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、*N*, *N'*-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、*N*-ベンジルフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩のような有機塩等のアミン塩；弗化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、*p*-トルエンスルホン酸塩のようなアリースルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、蔞酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；及び、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。

**【0035】**

なお、本発明の化合物及びその塩は、水和物としても存在することができ、本発明は、それらの水和物をも包含する。

**【0036】****2. 検体**

本発明で遺伝子多型を検出する対象となる検体としては、核酸を含む試料を用いることができる。核酸としては一例として、ゲノムDNAを挙げることができるが、これに限定されない。

**【0037】**

例えば、ヒトの遺伝子の多型を検出するためにはヒトゲノムDNAを含む検体を用いることができ、マウスの遺伝子の多型を検出するためには、マウスゲノムDNAを用いることができる。ゲノムDNAは当業者に公知の方法で取得することができる。以下、ヒトのゲノムDNAを例にして説明するが、他の生物由来のゲノムDNAも同様に取得することができる。

**【0038】**

ゲノムDNAを得るための材料としては、被験者から採取されたあらゆる細胞（生殖細胞を除く）、組織、臓器等を使用することができるが、好ましくは末梢血から分離した白血球または単核球であり、最も好適には白血球である。これらの材料は、臨床検査において通常用いられる方法によって採取され得る。

**【0039】**

例えば白血球を用いる場合、まず被験者より採取した末梢血から周知の方法で白血球を分離する。次いで、得られた白血球にプロテイナーゼKとドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を加えてタンパク質を分解、変性させた後、フェノール/クロロホルム抽出を行うことによりゲノムDNA（RNAを含む）を得る。RNAは、必要に応じRNaseにより除去することができる。ただし、本発明はこれに限定されず、ヒトゲノムDNAを含む試

料からのゲノムDNAの抽出にあたっては、本発明の技術分野において周知の方法、すなわち文献（例えば、Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.)" Cold Spring Harbor Laboratory, NY参照）に記載されている方法や、市販のDNA抽出キット等を利用する方法も好ましく用いることができる。

#### 【0040】

DNAを含む検体は、PCRに用いることができる限度においてその純度は問わず、試料よりの粗抽出物、精製物等を用いることができる。

#### 【0041】

##### 3. 対象遺伝子の選択

遺伝子多型を検出する対象となる遺伝子は、少なくとも一部のヌクレオチド配列が既に知られており、その部分に多型が存在するものであればいずれでもよい。そのような遺伝子の一例として、薬効や薬の副作用に関与する薬物代謝遺伝子である、シトクロムP4501A2、シトクロムP4502A6、シトクロムP4502C9、シトクロムP4502C19、シトクロムP4502D6、シトクロムP4502E1などが知られている。また、チオプリンメチルトランスフェラーゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、UDP-グルクウロノシルトランスフェラーゼ、および、グルタチオンS-トランスフェラーゼや、疾患との関連遺伝子として、潰瘍性大腸炎の原因遺伝子としてのHLA、慢性関節リウマチの原因遺伝子としてのTCR $\alpha$ 、アルツハイマー病の原因遺伝子としてのAPOE4、精神分裂症の原因遺伝子としてのドーパミンD3受容体、躁鬱病の原因遺伝子としてのトリプトファン水酸化酵素、アルブミン尿症の原因遺伝子としてのアンジオテンシン前駆体、心筋梗塞の原因遺伝子としての血液凝固因子VII及び肥満の原因遺伝子としてのレプチンなどを挙げることができる。その他、human prothrombin等を挙げることにもできる。

。

#### 【0042】

また、マウスのゲノムDNAを検体として用いる場合にはマウスのアンジオポエチン関連蛋白質3 (Angiopoietin-like protein 3)のプロモーター上の多型及び、欠失多型も挙げることができる。

#### 【0043】

なお、遺伝子中の多型の位置は翻訳領域、非翻訳領域、プロモーター、イントロン等の調節領域及びその他の領域のいずれであってもよい。

#### 【0044】

##### 4. オリゴヌクレオチドプライマー

以下のオリゴヌクレオチドは、核酸自動合成機を用いて合成することができる。

#### 【0045】

天然のオリゴヌクレオチドについては天然のホスホロアミダイトを使用して合成することができる。2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチドについては特許第3420984号の実施例14(5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例27(5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例5(5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-4-N-ベンゾイルシチジン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例22(5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-4-N-ベンゾイル-5-メチルシチジン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例9(5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-5-メチルウリジン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)に記載の化合物を用いることによって合成することができる。

#### 【0046】

##### (1) 遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド

本発明で用いる遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドとしては、以下の(a)及び/又は(b)を挙げることができる。

## 【0047】

(a) 3' 末端部位から 2 番目のヌクレオチド以外が基準配列に相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド

以下の(i)乃至(v)の特徴を有する;

- (i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、
- (ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、
- (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、
- (iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、
- (v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さは PCR によって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは 15~40 ヌクレオチド、より好ましくは 18~35 ヌクレオチド、更に好ましくは 18~25 ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

## 【0048】

このような特徴を有するオリゴヌクレオチドを、以下、「N-PRIMER」と呼ぶことにする。

## 【0049】

(b) 3' 末端部位から 2 番目のヌクレオチド以外が変異配列に相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド

以下の(i)乃至(v)の特徴を有する;

- (i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、
- (ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、
- (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、
- (iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、
- (v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さは PCR によって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは 15~40 ヌクレオチド、より好ましくは 18~35 ヌクレオチド、更に好ましくは 18~25 ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

このような特徴を有するオリゴヌクレオチドを、以下、「P-PRIMER」と呼ぶことにする。

## 【0050】

上記 (a) 及び (b) 中の(iv)において、オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目のヌクレオチドが 2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットであるとは、3 番目のヌクレオチドを天然型のヌクレオチドではなく、ENA ヌクレオチドであることを意味する。例えば、A<sup>P</sup> の代わりに A<sup>e 2 P</sup>、G<sup>P</sup> の代わりに G<sup>e 2 P</sup>、C<sup>P</sup> の代わりに 5 C<sup>e 2 P</sup> または C<sup>e 2 P</sup>、T<sup>P</sup> の代わりに T<sup>e 2 P</sup> を用いることを意味する。

## 【0051】

なお、本ヌクレオチドを PCR 用フォワード・プライマー (Forward primer) と呼ぶこともある。

## 【0052】

(2) 対になって用いられるオリゴヌクレオチド



## (a) PCR用オリゴヌクレオチド

PCRにおいて上記(1)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドの配列は、遺伝子多型を検出する対象となる遺伝子のヌクレオチド配列において、上記(1)の遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドと対になってPCRによって対象の遺伝子中の目的の配列を増幅できる限りにおいて特に制限されないが、具体的には相補鎖にあたる配列中の最も5'末端側の位置よりもさらに5'末端側領域に存在する相補鎖の配列中の連続した15~40ヌクレオチド、好ましくは18乃至35ヌクレオチド、更に好ましくは18乃至25ヌクレオチドの任意の部分配列からなる。ただし、遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドに互いに相補的な配列が存在すると、お互いにアニーリングすることにより非特異的な配列が増幅され、特異的な遺伝子多型の検出の妨げとなるおそれがあるので、そのような組み合わせを避けたオリゴヌクレオチド及び対になるオリゴヌクレオチドの設計を行うことが好ましい。

## 【0053】

なお、本明細書においては、対になるオリゴヌクレオチドをリバース・プライマー (Reverse primer) と呼ぶこともある。

## 【0054】

## (b) TaqManプローブ

TaqMan PCRで用いる遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド (TaqManプローブ) は5'末端はFAMやVICなどの蛍光レポーター色素によって標識されており、同時に3'末端はクエンチャーで標識されており [ジェネティック・アナリシス (Genet. Anal.), 14, p143-149 (1999), ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオリロジー (J. Clin. Microbiol.), 34, p2933-2936 (1996)]。

## 【0055】

上記(1)に記載のオリゴヌクレオチド該ヌクレオチドと対になって用いられるTaqManプローブの配列は、遺伝子多型を検出する対象となる遺伝子のヌクレオチド配列において、上記(1)の遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドと対になってPCRによって対象の遺伝子中の目的の配列を増幅できる限りにおいて特に制限されないが、具体的には相補鎖にあたる配列中の最も5'末端側の位置よりもさらに5'末端側領域に存在する配列中の連続した15~40ヌクレオチド、好ましくは18乃至35ヌクレオチド、更に好ましくは18乃至25ヌクレオチドの任意の部分配列からなる。ただし、遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドとTaqManプローブに互いに相補的な配列が存在すると、お互いにアニーリングすることにより非特異的な配列が増幅され、特異的な遺伝子多型の検出の妨げとなるおそれがあるので、そのような組み合わせを避けたオリゴヌクレオチド及びTaqManプローブの設計を行うことが好ましい。

## 【0056】

## 5. 遺伝子多型の検出方法

## A. PCRによる遺伝子多型の検出

## (1) PCR

上記「4. オリゴヌクレオチドプライマー」の項の「(1) 遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド」の項目で設計した遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチド及び該ヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとを用いたPCR反応を行うことにより、対象遺伝子の所定の位置の多型を検出することができる。ここでPCRは(i)「N-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、(ii)「P-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、(iii) (i)と(ii)の組み合わせのいずれかの組み合わせで行うことができる。

## 【0057】

PCRの反応条件は所望の核酸配列を増幅できる限りにおいて特に制限されず、当業者が通常行う条件でPCRを行うことができるが、例えば、以下のようにして行うことがで

きる。

#### 【0058】

##### (a) 核酸合成酵素

核酸合成酵素としては、鋳型の核酸の種類に応じて、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼおよび逆転写酵素(reverse transcriptase)から適宜選択して用いることができる。ここで、DNAポリメラーゼとしては、例えば、*Thermus aquaticus*由来のTaq DNAポリメラーゼ、*Thermus thermophilus*由来のTth DNAポリメラーゼ、*Pyrococcus*由来のKOD、PfuあるいはPwoDNAポリメラーゼ、あるいは前記の耐熱性ポリメラーゼの混合等があるが、これらにのみ限定されるものではない。なおTth DNAポリメラーゼはRT活性も有しているため、RT-PCRをOne tube-One stepで行うときに、1種類の酵素で賄うことが出来る特徴を有している。逆転写酵素は、RNAをcDNAに逆転写出来る酵素を意味する。逆転写酵素としては、Rous associated virus(RAV)やAvian myeloblastosis virus(AMV)等のトリのレトロウイルス由来の逆転写酵素、Moloney murine leukemia virus(MMLV)等のマウスのレトロウイルス由来の逆転写酵素あるいは前記のTth DNAポリメラーゼ等があるが、これらにのみ限定されるものではない。

#### 【0059】

##### (b) PCR反応

PCR反応は例えば、以下のとおりである。

#### 【0060】

反応液組成の例:

塩化マグネシウム 2乃至2.5mM (好ましくは2.5mM);

1×PCR緩衝液(10mM トリス-塩酸(25℃におけるpH8.3乃至9.0 (好ましくは8.3))、50mM 塩化カリウム;

dNTPs 0.2乃至0.25mM (好ましくは0.25mM);

遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド及び該ヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチド 0.2乃至0.5μM (好ましくは0.2μM);

Taqポリメラーゼ 1乃至2.5単位 (好ましくは2.5単位);

滅菌水を加えて全量を80μlに調整し、その全量を、逆転写反応を終了した反応液全量に加えてからPCRを開始する。

#### 【0061】

反応温度条件: まず94℃で2分間加熱した後、90乃至95℃ (好ましくは94℃)で30秒間、40乃至65℃ (好ましくは、プライマーの特性から算出される解離温度(T<sub>m</sub>)からそれより20度低い温度までの範囲内で30秒間、70乃至75℃ (好ましくは72℃)で1.5分間の温度サイクルを28乃至50サイクル (好ましくは30サイクル)繰り返してから、4℃に冷却する。

#### 【0062】

##### (2) 遺伝子多型の検出

PCR終了後、反応液を電気泳動し、目的配列の大きさのバンドが増幅されているか否かを検出する。

#### 【0063】

##### (a) 「N-PRIMER」を用いた場合

「N-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、多型はないと判定することができる。

#### 【0064】

一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

#### 【0065】

## (b) 「P-PRIMER」を用いた場合

「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

## 【0066】

一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有しないと判定することができる。

## 【0067】

## (c) 「N-PRIMER」及び「P-PRIMER」の両方を用いた場合

「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認でき、「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できない場合には、遺伝子多型はないと判定することができる。

## 【0068】

一方、「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できず、「P-PRIMER」と該ヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、遺伝子多型を有すると判定することができる。

## 【0069】

上記と同様の実験をENAオリゴヌクレオチドを含まない、オリゴヌクレオチドで行うと本来バンドが出ないはずの鑄型となる核酸に対してもミスマッチによるバンドの出現が確認される場合があり、本方法は従来の方法に比べ感度よく遺伝子多型を検出できることが確認できる。また、ENAユニットの代わりにLNAを用いた場合もミスマッチが確認される場合がある。

## 【0070】

## B. TaqMan PCRによる遺伝子多型の検出

上記、「A.」の項目において遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドと上記「4.」の項目に記載のTaqManプローブを用い、ABI社ABI PRISM等を用い、その添付プロトコールに従ってTaqman PCRを行うことによって遺伝子多型を検出することができる。

## 【0071】

## (a) 「N-PRIMER」を用いた場合

「N-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるTaqMan PCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型はないと判定することができる。

## 【0072】

一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

## 【0073】

## (b) 「P-PRIMER」を用いた場合

「P-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

## 【0074】

一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有しないと判定することができる。

## 【0075】

(c) 「N-PRIMER」及び「P-PRIMER」の両方を用いた場合

「N-PRIMER」と TaqMan プローブとの組み合わせによる PCR によって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認でき、「P-PRIMER」と TaqMan プローブとの組み合わせによる PCR によって目的とする配列の増幅が確認できない場合には、遺伝子多型を有しないと判定することができる。

## 【0076】

一方、「N-PRIMER」と TaqMan プローブとの組み合わせによる PCR によって目的とする配列の増幅が確認できず、「P-PRIMER」と TaqMan プローブとの組み合わせによる PCR によって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、遺伝子多型を有しないと判定することができる。

## 【0077】

C. MALDI-TOF/MS 法による遺伝子多型の検出

MALDI-TOF/MS 法による多型の検出法（「SNP 遺伝子多型の戦略」（中村祐輔編），中山書店，東京，（2000），p. 106-117）に記載の方法を一部改変することによって遺伝子多型を検出することができる。以下、具体的に説明する。

## 【0078】

多型部位を含む PCR 産物をゲノム DNA より増幅する。その際、多型部位の塩基と PCR プライマーは重複しないように設計する。

## 【0079】

次に PCR 反応系に残存している dNTP とプライマーとして用いたオリゴヌクレオチドを除去し、精製 PCR 産物とする。

## 【0080】

精製 PCR 産物を鋳型として、上記「4.」の「（1）遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド」に記載のオリゴヌクレオチドを鋳型に対して 10 倍以上の過剰量加え、90 乃至 95℃ でアニールさせ、サーマルサイクル反応を行う。サーマルサイクル反応はオリゴヌクレオチドの伸張反応が確認される限りにおいて特に制限されないが、例えば、94℃ と 37℃ の 2 温度間で 25 回の反応で、適当な伸張効率が得られる。

## 【0081】

得られた伸張反応産物を精製し、塩、緩衝液、界面活性剤、蛋白を除去する。この精製物を MALDI プレートにスポットし、MALDI-TOF/MS によって質量を分析する。

## 【0082】

対象遺伝子の多型部位が遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドと相補的なオリゴヌクレオチドであるときには遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドに ddNTP が付加された伸張反応産物の蓄積が確認されるが、多型部位が遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドと相補的でないときは伸張反応産物は蓄積されない。

## 【0083】

「N-PRIMER」を用いた場合に伸張反応産物が確認されれば、多型部分は基準ヌクレオチドであり、多型を有しないと判定することができ、伸張反応産物が確認されなければ、多型部分は変異ヌクレオチドであり、遺伝子多型を有すると判断できる。

## 【0084】

また、「P-PRIMER」を用いた場合に伸張反応産物が確認されれば、多型部分は変異ヌクレオチドであり、多型を有すると判断でき、伸張反応産物が確認されなければ、多型部分は基準ヌクレオチドであり、遺伝子多型を有しないと判断できる。

## 【0085】

また、キアゲン社 (Qiagen) のLightCycler systemとそれを用いてPCR産物を検出するキット (Quantitect SYBR Green PCR Kit) 等に応用することによって生成するPCR産物の有無を検出することなどを用いて、PCR産物を測定することも可能である。

【0086】

6. 遺伝子多型の存在状態の確認

本発明の方法によると鋳型となる核酸中の多型がヘテロで存在するかホモで存在するかを判定することができる。具体的には以下の (a) 乃至 (c) のいずれかの方法によって判定することができる。

【0087】

(a) 「N-PRIMER」を用いた場合

「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合に、ホモであることが分かっている検体に比べ目的とするバンドの出現量が約半分になっている場合には、多型は基準ヌクレオチドと変異ヌクレオチドのヘテロであると判定することができる。

【0088】

(b) 「P-PRIMER」を用いた場合

「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合に、ホモであることが分かっている検体に比べ目的とするバンドの出現量が約半分になっている場合には、多型は基準ヌクレオチドと変異ヌクレオチドのヘテロであると判定することができる。

【0089】

(c) 「N-PRIMER」及び「P-PRIMER」の両方を用いた場合

「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認でき、「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによっても目的とする配列の増幅が確認できる場合には、多型はヘテロであると判定することができる。

【0090】

7. 遺伝子多型検出用キット

本発明の方法を行うために使用するプライマー及び試薬類を遺伝子多型検出用キットとして提供することができる。そのようなキットは以下の物を含む。

キット1:

(a) 以下の(i)乃至(v)の特徴を有するオリゴヌクレオチド:

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さはPCRによって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは15~40ヌクレオチド、より好ましくは18~35ヌクレオチド、更に好ましくは18~25ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマー;

(c) DNAポリメラーゼ;

(d) PCR緩衝液。

## 【0091】

キット2:

- (a) 以下の特徴を有するオリゴヌクレオチド:
- (i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、
  - (ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、
  - (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、
  - (iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、
  - (v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さはPCRによって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは15~40ヌクレオチド、より好ましくは18~35ヌクレオチド、更に好ましくは18~25ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。
- (b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマー;
- (c) DNAポリメラーゼ;
- (d) PCR緩衝液。

## 【0092】

本発明のキットには、場合によっては電気泳動用の各種試薬、dNTP、電気泳動用マーカー等を含ませることもできる。

## 【実施例】

## 【0093】

以下、実施例、参考例及び試験例にて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、下記実施例において、遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング(Molecular Cloning)」[Sambrook, J., Fritsch, E.F. および Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊]に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

## 【0094】

(実施例1)  $\text{HO-C}^{\text{P}}-\text{A}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{G}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{A}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{G}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{A}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{A}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{A}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{G}^{\text{e}2\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{G}^{\text{t}}$

の合成

核酸自動合成機(パーキンエルマー社製 ABI model 394 DNA/RNA synthesizer)を用い、40 nmolのプログラムで $\text{HO-C}^{\text{P}}-\text{A}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{G}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{A}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{G}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{A}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{A}^{\text{P}}-\text{C}^{\text{P}}-\text{A}^{\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{G}^{\text{e}2\text{P}}-\text{T}^{\text{P}}-\text{G}^{\text{t}}$ を合成した(以下、「プライマーA」とする。各合成サイクルにおける溶媒、試薬、ホスホロアミダイトの濃度は天然オリゴヌクレオチド合成の場合と同じものを用いた。CPGは、約0.1  $\mu\text{mol}$ 用いた。非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第3420984号の実施例27(5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)の化合物を用いた。目的配列を有する保護されたオリゴヌクレオチド類縁体を濃アンモニア水で処理することによってオリゴマーを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基と核酸塩基上の保護基をはずした。溶媒を減圧下留去し、残った残渣を逆相HPLC(島津製作所製LC-10VP、カラム(Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6 $\times$ 100mm))、A溶液:5%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B溶液:アセトニトリル、B%:10% $\rightarrow$ 50%(10min, linear gradient); 60 $^{\circ}\text{C}$ ; 2 ml/min; 254 nm)にて精製し、ジメトキシトリチル基を有する目的物のピークを集めた。水を加え、減圧下留去することで、TEAAを除いた。80%酢酸水溶液(200  $\mu\text{l}$ )を加え

、20分放置することで、ジメトキシトリチル基の脱保護を行った。溶媒を留去したのち逆相HPLC（島津製作所製LC-10VP、カラム（Merck, Chromolith Performance RP-18e（4.6×100mm））、A溶液：5%アセトニトリル、0.1M TEAA, pH 7.0、B溶液：25%アセトニトリル、0.1M TEAA、B%：0%→40%（10min, linear gradient）；60℃；2 ml/min；254 nm）にて精製し、目的物のピークを集めた。減圧下溶媒を留去後、水1mlに溶かし、MALDI-TOF質量分析により同定した（計算値：7625.0、測定値：7624.1）。

#### 【0095】

本化合物（プライマーA）の塩基配列は、GenBank accession No.AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号 60522のCがTであって、ヌクレオチド番号 60523のAがGになっている配列である。

#### 【0096】

（実施例2）HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>

の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>

（以下「プライマーB」とする。）を、実施例1と同様の方法で合成し、MALDI-TOF質量分析により同定した（計算値：7609.0、測定値：7609.2）。

#### 【0097】

本化合物（プライマーB）の塩基配列は、GenBank accession No.AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号 60522のCがTになっている配列である。

#### 【0098】

（実施例3）HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>t</sup>

の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>t</sup>

（以下、「プライマーC」とする。）を、実施例1と同様の方法で合成し、MALDI-TOF質量分析により同定した（計算値：7650.0、測定値：7649.4）。

#### 【0099】

本化合物（プライマーC）の塩基配列は、GenBank accession No.AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号 60522のCがGであって、ヌクレオチド番号 60523のAがGになっている配列である。

#### 【0100】

（実施例4）HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>

の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>（以下、「プライマーD」とする。）を、実施例1と同様の方法により合成し、MALDI-TOF質量分析により同定した（計算値：7634.1、測定値：7634.2）。

#### 【0101】

本化合物（プライマーD）の塩基配列は、GenBank accession No.AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号 60522のCがGになっている配列である。

#### 【0102】

（参考例1）HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>t</sup>

の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>t</sup>

(以下、「プライマーE」とする。)を核酸自動合成機を用いて常法により合成した。本化合物(プライマーE)の塩基配列は、GenBank accession No.AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号 60522のCがTであって、ヌクレオチド番号 60523のAがGになっている配列であり、配列表の配列番号1に示されている。

**【0103】**

(参考例2)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>

(以下、「プライマーF」とする。)を核酸自動合成機を用いて常法により合成した。本化合物(プライマーF)の塩基配列は、GenBank accession No.AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号 60522のCがTになっている配列であり、配列表の配列番号2に示されている。

**【0104】**

(参考例3) HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>t</sup>の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>t</sup>

本(以下、「プライマーG」とする。)は核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

**【0105】**

プライマーGの塩基配列は、GenBank accession No.AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号 60522のCがGであって、ヌクレオチド番号 60523のAがGになっている配列であり、配列表の配列番号3に示されている。

**【0106】**

(参考例4)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>

本(以下、「プライマーH」とする。)を核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

**【0107】**

プライマーHの塩基配列は、GenBank accession No.AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号 60522のCがGになっている配列であり、配列表の配列番号4に示されている。

**【0108】**

(試験例1) アンジオポエチン様タンパク質3 (Angiopoietin-like protein 3) 遺伝子プロモーター内のSNPの検出

マウスAKR 系統 (strain) 及びKKマウスNga 系統 (strain) 由来マウス (4週齢) より採取した尾 (1.5 cm) を 840  $\mu$ l の溶解液 (720  $\mu$ l の 1 $\times$ SSC、80  $\mu$ l の 10% SDS、40  $\mu$ l の 10 mg/ml プロテイナーゼKを含む) に浸漬し、50℃で保温しながら一晩振盪した。次いで、1 mg/ml リボヌクレアーゼAを20  $\mu$ l 加えて、50℃で1時間保温した。その後、フェノール・クロロホルム抽出を2回、エタノール沈殿操作を1回行い、沈殿を10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、1 mM EDTAを含む緩衝液150  $\mu$ l に溶解した。その後、分光光度計 (U-3000、(株) 日立製作所製) で260 nm波長における吸光度を測定し、滅菌水を加えて濃度を25 ng/ $\mu$ l に調整してゲノムDNA試料とした。

**【0109】**

Angiopoietin-like protein 3遺伝子プロモーター内のSNPは、direct sequenceの結果から、図3のようなSNPを持つ。

**【0110】**

リバース・プライマー (Reverse primer) のヌクレオチド配列は：



5' -GTCAGTACTACTGCTTACTGTCC-3' (配列表の配列番号 5)、

(本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 606 58-60682に相補的な配列である。) である。

【0111】

Premix Taq(宝酒造製)12.5  $\mu$ L、ゲノム DNA溶液(100 ng/1 $\mu$ L) 0.125  $\mu$ L、リバー  
・プライマー(1.25  $\mu$ M) 5 $\mu$ L、滅菌水2.38  $\mu$ L、フォワード・プライマー (forward pri  
mer) として実施例 (または、参考例) の化合物(1.25  $\mu$ M)を5  $\mu$ Lになるように調製し、  
Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (TP240)を使って、PCR反応 (Hot Start法)を行っ  
た。反応サイクルは、94 $^{\circ}$ C、10分後、94 $^{\circ}$ C1分、63 $^{\circ}$ C1分、72 $^{\circ}$ C1分、これを30サイクル繰  
り返した。

【0112】

反応後、反応液5  $\mu$ Lに1  $\mu$ Lの添加液 (loading solution) を加え、10%ポリアクリル  
アミドゲル電気泳動 (1xTBE, 200V定電圧, 約1時間)を行い、SYBR Green I (Cambrex社  
製)で染色後、Molecular Imager FX Fluorescent Imager system (Bio-Rad)を用い可視化  
した。

【0113】

PCR反応が正確に行われた場合、マウスAKR 系統 (strain) 由来のゲノムDNA (AKR)  
を用いた場合、選択的に遺伝子 (182 bp) が増幅され、KKマウスNga 系統 (strain) 由来  
のゲノムDNA (KK/Nga) を用いた場合、選択的に遺伝子 (184 bp) が増幅されると予想さ  
れた。

【0114】

結果を図4に示す。プライマーE又はプライマーFをフォワード・プライマーとしてP  
CRを行ったところ、マウスAKR 系統由来のゲノムDNAでは、プライマーEをプライマ  
ーとして用いた場合に遺伝子の増幅が確認された。一方、KKマウスNga 系統由来のゲノム  
DNAにおいては、プライマーFをプライマーとして用いた場合及びプライマーEをプライ  
マーとして用いた場合の両方で遺伝子の増幅が観察された。

【0115】

またプライマーA又はプライマーBをプライマーとしてPCRを行ったところ、マウス  
AKR 系統由来のゲノムDNAでは、プライマーAをプライマーとして用いた場合に遺伝子  
が増幅され、KKマウスNga 系統由来のゲノムDNAにおいては、プライマーBをプライマ  
ーとして用いた場合に遺伝子の増幅が観察された。

【0116】

プライマーG又はプライマーHをプライマーとして用いた場合、マウスAKR 系統由来の  
ゲノムDNAでは、プライマーGをプライマーとして用いた場合に目的の遺伝子産物が増  
幅されたが、プライマーHをプライマーとした場合には、目的の大きさより小さい副生成  
物と考えられる増幅産物が得られた。また、KKマウスNga 系統由来のゲノムDNAにおい  
ては、プライマーHをプライマーとした場合には、目的の遺伝子産物だけでなく、目的よ  
りも小さい鎖長を持つ副生成物と考えられる増幅産物が得られた。

【0117】

プライマーA又はプライマーBをプライマーとして用いた場合、マウスAKR 系統由来のゲ  
ノムDNAでは、プライマーAをプライマーとして用いた場合に遺伝子が増幅され、さら  
に、KKマウスNga 系統由来のゲノムDNAにおいては、プライマーBをプライマーとして  
用いた場合に遺伝子の増幅が観察された。

【0118】

以上のことからENAユニットを3' 末端から3番目に導入したプライマーを用いることに  
より、ENAユニットを導入していない、従来のプライマーと比べて検出効率が向上する  
ことが確認できた。

【産業上の利用可能性】

【0119】

本発明の方法により、遺伝子多型の検出が可能となる。また、本発明の遺伝子多型の検

出方法を用いることにより、天然型のオリゴヌクレオチドを用いる場合に比べより正確に多型を検出できるようになる。

【0120】

また、該方法に用いることができる、遺伝子多型の検出用オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する遺伝子多型の検出用キットによって、種々の遺伝子多型を検出できる。本発明は、医療、農業、食品、工業等の種々の産業に利用することができるが、遺伝子多型の検出を必要とする限りにおいて産業分野は制限されない。

【図面の簡単な説明】

【0121】

【図1】 遺伝子多型の検出方法の原理を示す図。多型がない場合を示す。

【図2】 遺伝子多型の検出方法の原理を示す図。多型がある場合を示す。

【図3】 アンジオポエチン関連蛋白質3遺伝子プロモーター内の多型を示す図。

【図4】 Premix Taqを用いて各種プライマーを用いたPCRの結果を示す図。

【配列表フリーテキスト】

【0122】

配列番号1：プライマーE

配列番号2：プライマーF

配列番号3：プライマーG

配列番号4：プライマーH

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Method for identifying polymorphism

<130> 2004037SU

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Inventor: Koizumi, Makoto

<220>

<223> primer E

<400> 1

catgtctact gctacttcac atgtg

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer F

<400> 2

catgtctact gctacttcac atgta

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer G

<400> 3

catgtctact gctacttcac atggg

25

<210> 4  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

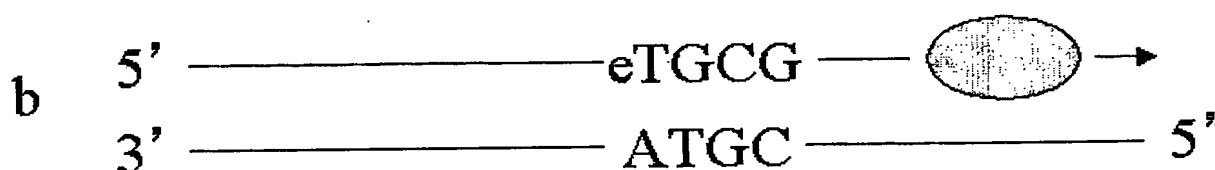
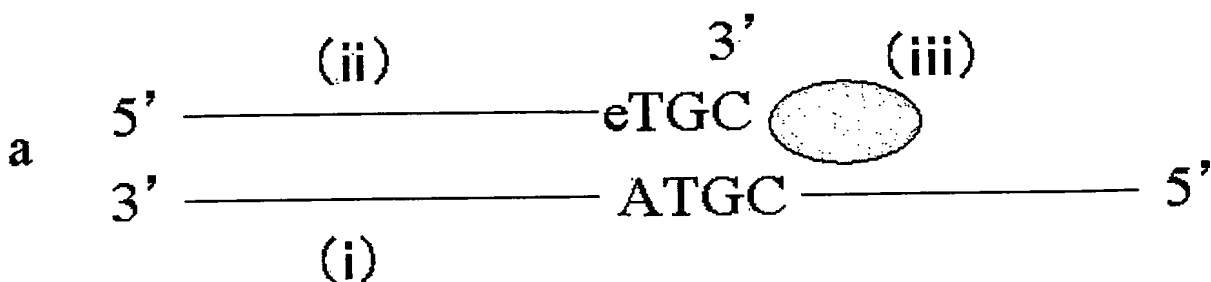
<220>  
 <223> primer H

<400> 4  
 catgtctact gctacttcac atgga 25

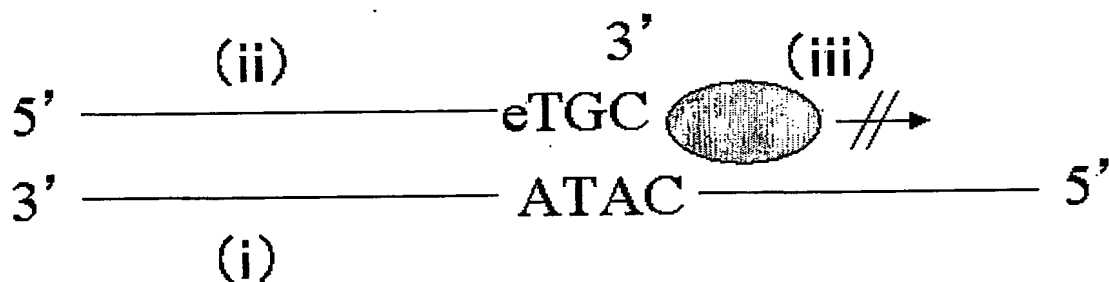
<210> 5  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 5  
 gtcactagac tactgcttac tgtcc 25

【書類名】 図面  
【図 1】



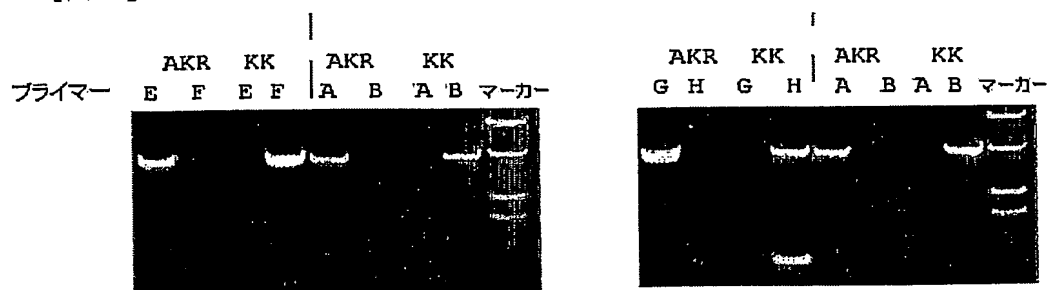
【図 2】



【図 3】

(KK/Nga) A  
(AKR) --CATGTCTACTGCTACTTCACATGCG--  
Primer 5' CATGTCTACTGCTACTTCACATGKG3'  
5' CATGTCTACTGCTACTTCACATGKA3'  
K=G/T, G=ENA

【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝子多型を検出する方法及び該方法に使用することができるオリゴヌクレオチドを提供し、さらに、該オリゴヌクレオチドを含む遺伝子多型検出用キットを提供すること。

【解決手段】 合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列の 3' 末端を多型部位にし、3' 末端から 2 番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではない塩基を持つヌクレオチドにし、3' 末端から 3 番目のヌクレオチドとして 2' -O, 4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットを用いたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いること。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-121080
受付番号	50400649245
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成16年 4月19日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成16年 4月16日

特願 2 0 0 4 - 1 2 1 0 8 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 1 8 5 6 ]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 1 5 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本町 3 丁目 5 番 1 号

氏 名 三共株式会社